

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2005-2008

課題番号：17590600

研究課題名（和文）ストレス応答における性差の解明・心身症モデル動物を用いた検討

研究課題名（英文） Analysis of sex differences in response to stress by use of model experimental animals for psychosomatic diseases

研究代表者

上山 敬司 和歌山県立医科大学・医学部・准教授・50264875

研究成果の概要：

ストレス応答における性差を性ホルモンレベルの変化から解明するため、エストロゲンとアンドロゲンの効果を検証した。たこつぼ型心筋症は閉経後の女性に好発し、著しい性差がある。我々は不動化ストレス負荷を負荷したラットはたこつぼ型心筋症の動物モデルに成り得ること、エストロゲンの慢性投与でこの収縮不全が改善することを示した。エストロゲンの作用機序を脳、副腎、心臓で解析した。エストロゲン補充により、辺縁系→視床下部→副腎→心臓の各レベルでストレス応答が低下したが、心臓における心血管系保護物質の発現が増加した。エストロゲンは自律神経系を介する間接作用、および心臓への直接作用により、情動的ストレスに対して心保護効果を示す。

男性においても加齢に伴うアンドロゲンの減少による男性更年期が注目されているが、アンドロゲンレベルの変化も中枢神経系でのストレス応答を修飾することが示唆された。またオスの心臓においても、エストロゲンは心血管系保護物質を増加させることでストレスによる心機能不全を改善することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	1,100,000	0	1,100,000
18年度	800,000	0	800,000
19年度	800,000	240,000	1,040,000
20年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（心身医学）

キーワード：性ホルモン、情動的ストレス、遺伝子発現、たこつぼ型心筋症、動物モデル、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

心身症とは、身体症状疾患の中で、その発症や経過に心理社会的因子（いわゆるストレス）が密接に関与し、器質的ないし機能的障害が認められ

る病態である。近年、ストレス応答は、個体・組織・細胞の各レベルで明らかにされている。細胞周囲の環境変化（熱、低酸素、活性酸素など）により細胞が直接影響を受ける場合（cellular

stress)と、脳を中心とした生体調節系、すなわち神経系・内分泌系を介して細胞に影響を与える場合があるが、そのいずれにおいても、細胞のストレス応答として *c-fos* を代表とする *immediate early genes (IEG)* などの遺伝子発現の変化が見られる。細胞レベルの『ストレス』と心身医学での『ストレス』を統合的に理解するため、私どもは心身症の臨床像を忠実に反映した動物モデルを開発し、心(中枢神経系)と身体(内臓)において、細胞レベルにまで還元した研究系を構築し、実際の心身症の理解と予防治療法の開発を目指している。その一例として、閉経後の女性において、強い情動的ストレスや身体的ストレスを契機に発症する「たこつぼ型心筋症」が、ラットのストレスモデルで再現できること、エストロゲンの低下でストレス負荷時の心機能が低下し、その補充で改善されることを見出した。

2. 研究の目的

ストレス応答の性差が、性ホルモンレベルの変化から説明できるか、またそれがどのような機序でおこるのかを明らかにすることである。閉経に伴うエストロゲンの減少は、たこつぼ型心筋症のみならず、多彩な心血管系や精神症状を呈する更年期障害を起こすことが知られている。また男性においても、加齢に伴うアンドロゲンの減少による男性更年期も注目されており、アンドロゲンもストレス応答を修飾する可能性がある。実際、消化性潰瘍においては、高齢男性の罹患率が高い。そこで、卵巣摘除およびエストロゲンあるいはアンドロゲン補充メスラット、精巣摘除およびアンドロゲンあるいはエストロゲン補充オスラットを用いて、オスとメスで、それぞれエストロゲンのレベルあるいはアンドロゲンのレベルを変化させて、ストレス負荷を行い、脳および心臓において、細胞レベルのストレス応答を神経解剖学的、生化学的、生理学的に検討した。

3. 研究の方法

- 成熟メスラットで卵巣摘除(低エストロゲン状態)とエストロゲン

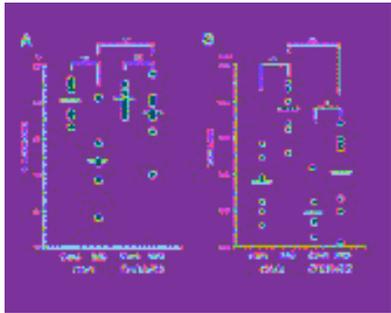
補充(高エストロゲン状態)、および成熟オスラットで精巣摘除(低アンドロゲン状態)とエストロゲン補充(オスでの高エストロゲン状態)、および正常オス(高アンドロゲン状態)したラットを実験動物として用いて、ストレス負荷を行い、ストレスによる心機能の変化、自律神経系の関与、中枢神経系でのプロセッシング、末梢(副腎、心臓、胃)での遺伝子応答や生理的、組織的变化を検討した。

- ストレス負荷の前後における心電図と左心室造影、心エコーで比較した。
- 細胞興奮の遺伝子マーカーである、*c-Fos* に対する抗体で免疫染色を行い、脳の詳細な *mapping* を行い、中枢神経レベルで、エストロゲンレベルあるいはアンドロゲンレベルの変化に伴って、ストレス応答が変化する領域を検索した。
- 経シナプスの逆行性輸送されるウイルストレーサー *PRV* を末梢交感神経や副腎髄質に投与し、ラベルされる領域を *mapping* し、ストレスに応答する領域と比較した。
- 中枢神経系においてストレス応答が変化する領域とエストロゲン受容体あるいはアンドロゲン受容体との関係を検討した。
- エストロゲンあるいはアンドロゲンによってストレス応答が修飾される領域のうち、扁桃体内側核への求心路を検討した。
- 自律神経-神経内分泌の中核である視床下部室傍核、その下流である副腎、心臓において、エストロゲンレベルの変化によるストレス応答のレベルを *c-fos mRNA* を指標に検討した。また心臓において、エストロゲンレベルの変化による内因性心保護物質の発現レベルを比較した。

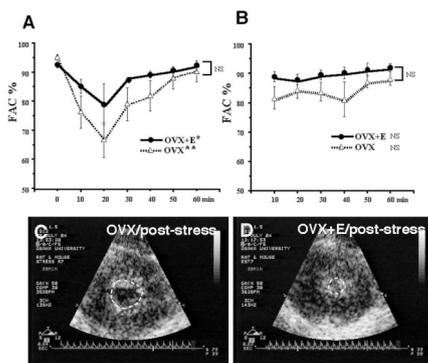
4. 研究成果

- ① エストロゲンレベルによる、ストレス負荷時の循環動態と心機能の変化

左心室造影では、*OVX* 群に比べ、*OVX+E* 群では、*IMO* 負荷による左心室収縮率の低下が抑制された(A)。またストレスによる頻脈も軽減した(B)。

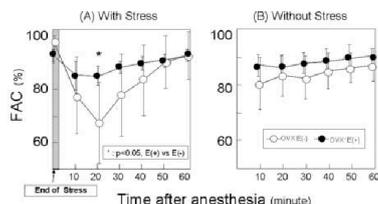


麻酔下の心エコー法でも、OVX+E群では、収縮率の低下は軽減した(A)。一方、麻酔だけでは収縮率の変化はなかった(B)。



ストレス末期での収縮期血圧の増加も、OVX+E群ではOVX群に比べて抑制された。

去勢オスと去勢後エストロゲン投与されたオスにおいても、エストロゲンは心機能を改善した。



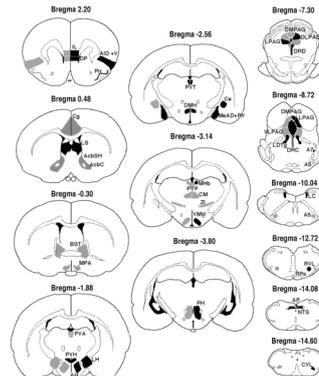
以上のような結果から、エストロゲンは、ストレス時の循環動態の変化(血圧上昇、頻脈、心収縮率の低下)を軽減することが示された。

② エストロゲンレベルにより、ストレス応答が変化する脳の領域

ストレスにより、大脳皮質、辺縁系、間脳、中脳、橋、延髄などの特定の領域でc-Fos発現が有意に増加した。ストレスによる有意差が認められた領域を右半側に黒色で示した。またエストロゲン投与の有無でc-Fos発現に有意差が認め

られた領域を、図の左半側に黒色で示した。エストロゲン投与の有無で有意差を認めた領域は、外側中隔核(LS)、視床室傍核(PVT)、視床下部室傍核(PVH)、視床下部背内側核(DMH)、扁桃体内側核(MeAD+PV)、外側中脳水道周囲灰白質(LPAG)、外側背側被蓋核(LDTg)、青斑核(LC)および孤束核(NTS)である。外側中隔核、視床下部室傍核、視床下部背内側核、扁桃体内側核、外側中脳水道周囲灰白質、外側背側被蓋核、青斑核ではエストロゲン投与群でc-Fos発現が低下し、逆に視床室傍核と孤束核では増加した。

エストロゲンによる差 (左半側) ストレスによる差 (右半側)



③ アンドロゲンレベルにより、ストレス応答が変化する脳の領域

外側中隔核(LS)、視床下部室傍核大細胞性部(PaLM)、視床下部室傍核小細胞性部(PaMP)、視床下部視索上核(SON)、視床下部背内側核(DMH)、扁桃体内側核(MeA)、青斑核(LC)、孤束核(NTS)でIMO群では、Sham群に比しc-Fos免疫陽性細胞数が有意に多かった。Cast+IMO群ではSham+IMO群に比べて、PaMPにおけるc-Fos免疫陽性細胞数は有意に少なく、SONとMeAでは有意に多かった。アンドロゲンもストレス負荷による中枢神経系の応答に影響するが、その効果は部位により異なることが示された。

④ 扁桃体内側核の神経解剖学的特性

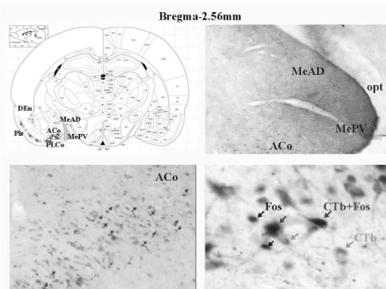
扁桃体内側核は、エストロゲンレベルの変化でもアンドロゲンレベルの変化でも、ストレス応答が変化する。そこで、エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体の存在を免疫組織化学的に検討したところ、いずれも受容体も神経核に存在した。

心臓に分布する交感神経節後線維

を送る星状神経節 (stellate ganglia) や副腎髄質に PRV を投与すると、最初に脊髄 IML の交感神経節前神経細胞に PRV が集積し、次に脳幹や視床下部の神経細胞に PRV の感染が進み、最終的により高次の神経系の細胞がラベルされる。PRV でラベルされる神経細胞は、脳幹の血管運動中枢で知られている吻側腹外側網様核、巨大細胞性網様核、外側傍巨大細胞性網様核、淡蒼縫線核、大縫線核、A5 ノルアドレナリン神経、背外側被蓋核、青斑核、中脳水道周囲灰白質、背側縫線核、脚傍核、間脳では、視床下部の諸核、内側手綱核、不確帯などに分布する。さらに辺縁系の外側中隔核、Broca の対角帯、分界条床核、側坐核、扁桃皮質核、内側核、中心核、海馬 CA1-3、扁桃皮質核、扁桃皮質、嗅外皮質、嗅内皮質などの神経細胞も、広範かつ密にラベルされる。帯状回や眼窩皮質はラベルされないが、前辺縁皮質、下辺縁皮質、島皮質、嗅周囲皮質、梨状葉ではラベルされる神経細胞が多く認められる。このような領域の神経細胞が興奮すれば、いくつかのシナプス連絡を介して、末梢交感神経-副腎髄質系が興奮、あるいは抑制されると考えられる。

扁桃体内側核にはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体が強く発現し、しかも交感神経系に投射している。実際、ストレス負荷でこの領域では c-Fos 発現が増加、つまりストレスに反応し、なおかつ性ホルモンのレベルでストレス反応が修飾される。従って、ストレス反応における性差を決める上で重要な領域であることが強く示唆された。

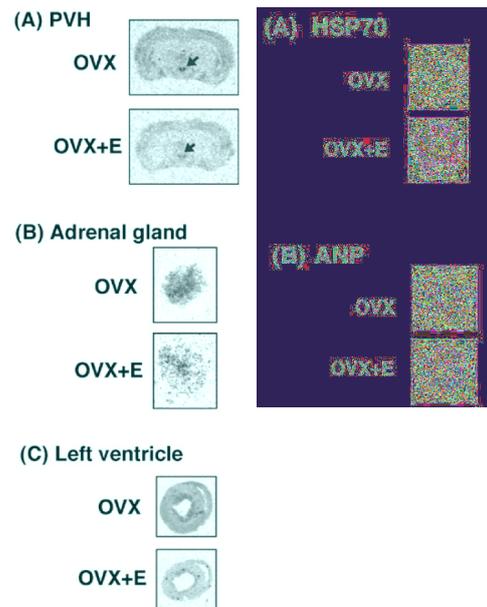
次に扁桃体内側核の上位の神経核を逆行性トレーサー法で検索した。同側の島皮質、梨状葉、下辺縁皮質、Broca の対角核、背側内梨状核、分界条床核、扁桃基底内側核、扁桃皮質核、扁桃-梨状野移行部、海馬 CA1、不確帯、外側脚傍核で CTb 陽性神経細胞を認めた。外側脚傍核では、対側にも CTb 陽性神経細胞が認められた。このうち、背側内梨状核と、海馬 CA1 以外の諸核で CTb と c-Fos との二重陽性神経細胞を認め、特に扁桃基底内側核、扁桃皮質核では、多数の二重陽性神経細胞が観察された。



ストレス反応の脳内メカニズムを解明するために、今後とも地道な研究の継続が必要である。

⑤ エストロゲンレベルによる、視床下部室傍核-副腎-心臓でのストレス反応の変化

視床下部室傍核においても、ERβ が強く発現している。扁桃体内側核や視床下部室傍核ではストレス負荷で c-Fos 発現が認められ、エストロゲンレベルの増加で c-Fos 発現が低下するが、下流にあたる副腎や心臓における c-fos mRNA レベルも低下することを示した。つまり、エストロゲンは脳だけではなく、交感神経-副腎髄質の過剰興奮を抑制し、ストレスの標的臓器での反応を緩和することが示唆された。



⑥ エストロゲンレベルによる、心臓での心保護物質の変化

エストロゲン受容体は心血管系でも発現しており、エストロゲンはこれらの細胞でも多くの作用を示す。エストロゲンレベルが低下すると心筋細胞で熱ショック蛋白 (HSP70) や心房性 Na 利尿ペプチド (ANP) の発現が低下する。つまりエストロゲンは、神経系を介する間接作用と心血管系の細胞に対する直接作用で、ストレス反応を緩和することが示された。

〔雑誌論文〕 (計 16 件)

1. Ueyama T, Kawabe T, Hano T, Tsuruo Y, Ueda K, Ichinose M, Kimura H, Yoshida K. Up-regulation of hemoxygenase 1 in an animal model of takotsubo

- cardiomyopathy. *Circ J*, 2009. in press
査読あり
2. 上山敬司, 石蔵文信. たこつぼ心筋症とその動物モデル. *心身医学* 2009. 印刷中
 3. 上山敬司. 自律神経の中樞神経回路の解析. *自律神経* 2009. 印刷中
 4. 上山敬司, 鶴尾吉宏. 情動的ストレスによる、心臓での酸化ストレス. *自律神経* 2009. 印刷中
 5. 上山敬司. たこつぼ型心筋症の機序-動物実験からの新規視点. *循環器科*, 2009. 印刷中
 6. Akashi YJ, Goldstein DS, Barbaro G, Ueyama T. Takotsubo Cardiomyopathy: A New Form of Acute, Reversible Heart Failure. *Circulation* 118:2754-2762, 2008. 査読あり
 7. Ueyama T, Kasamatsu K, Hano T, Tsuruo Y, Ishikura F. Catecholamines and estrogen are involved in the pathogenesis of emotional stress-induced acute heart attack. *Ann NY Acad Sci* 1148:479-480, 2008. 査読あり
 8. Kohno T, Hara Y, Takamata A, Ueyama T, Morimoto K. Effect of estrogen on stress-induced activation of peptide neurons in PVN of ovariectomized rats. *Ann NY Acad Sci* 1148:99-105, 2008. 査読あり
 9. Morimoto K, Uji M, Ueyama T, Kimura H, Kohno T, Takamata A, Yano S, Yoshida K. Estrogen replacement suppress pressor response and oxidative stress induced by cage-switch stress in ovariectomized rats. *Ann NY Acad Sci* 1148:213-218, 2008. 査読あり
 10. Ueda K, Ueyama T, Yoshida K, Kimura H, Ito T, Shimizu Y, Oka M, Tsuruo Y, Ichinose M. Adaptive HNE-Nrf2-HO1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *Am J Physiol* 295: G460-G469, 2008. 査読あり
 11. 上山敬司, 仙波恵美子. 中樞の自律神経回路. *神経内科* 68:235-244, 2008.
 12. 上山敬司, 鶴尾吉宏, 石蔵文信. エストロゲンは心血管系と神経系とに作用し、情動的ストレスとカテコラミンで誘発される急性心不全を改善する. *自律神経* 45:98-100, 2008. 査読あり
 13. Ueyama T, Ishikura F, Matsuda A, Asanuma T, Ueda K, Ichinose M, Kasamatsu K, Hano T, Akasaka T, Tsuruo Y, Morimoto K, Beppu S. Chronic estrogen supplementation following ovariectomy improves the emotional stress-induced cardiovascular responses by indirect action on the nervous system and by direct action on the heart. *Circ J* 71:565-573, 2007. 査読あり
 14. Ueyama T, Tanioku T, Nuta J, Kujira K, Ito T, Nakai S, Tsuruo Y. Estrogen alters c-Fos response to immobilization stress in the brain of ovariectomized rats. *Brain Res* 1084:67-79, 2006. 査読あり
 15. 上山敬司, 鶴尾吉宏. 卵巣摘除後のエストロゲン補充により、脳でのストレス応答が抑制される. *自律神経* 43:398-401, 2006. 査読あり
 16. 上山敬司, Loewy AD. たこつぼ心筋症の神経解剖学的解析. *The Circulation Frontier* 10: 28-34, 2006.
- [学会発表] (計 23 件)
1. 石蔵文信, 上山敬司. Preventive effects of estrogen and beta blocker on stress-induced cardiac dysfunction in an experimental rat model. 第73回日本循環器学会総会. 2009. 3 大阪
 2. 上山敬司, 川辺哲也, 羽野卓三, 吉田謙一. Up-regulation of cyclooxygenase 2 in an Animal Model of Takotsubo Cardiomyopathy. 第73回日本循環器学会総会. 2009. 3 大阪
 3. 上山敬司, 鶴尾吉宏. たこつぼ心筋モデルにおける、ヘムオキシゲナーゼの増加. 第61回日本自律神経学会総会, 横浜, 2008.11
 4. 上山敬司. 中樞の自律神経回路. 第61回日本自律神経学会, 横浜, 2008.11
 5. Ueyama T, Akashi YJ. Takotsubo cardiomyopathy: a form of severe, reversible heart failure evoked by emotional distress in post-menopausal women. First International Symposium on Cardiac Sympathetic Neuroimaging, 10Kauai, Hawaii, USA, 2008. 10
 6. Ueyama T, Yoshida K, Kimura H. Up-regulation of hemeoxygenase 1 in an animal model of takotsubo cardiomyopathy. 19th International Symposium on the Autonomic Nervous System, Kauai, Hawaii, USA, 2008.10
 7. 上山敬司, 石蔵文信. たこつぼ心筋症の実験的解析. 第49回日本心身医学会総会, 札幌, 2008. 6
 8. 上山敬司, 伊藤隆雄, 鶴尾吉宏. 情動的ストレス誘発心不全におけるヘムオキシゲナーゼの増加. 第113回日本解剖学会総会, 大分, 2008. 3
 9. 上山敬司, 笠松 謙, 吉田謙一. Up-regulation of Hemeoxygenase 1 in an

- Animal Model of Takotsubo
Cardiomyopathy. 第72回日本循環器学
会総会, 博多, 2008.3
10. Ueyama T, Tsuruo Y. Estrogen modulates
the emotional stress- and
catecholamine-induced acute heart failure.
5th congress of the international society for
autonomic neuroscience, Kyoto, Japan,
2007.10
 11. Ueyama T, Tsuruo Y, Akashi YJ. Surge
of catecholamines and reduction of
estrogen trigger the emotional
stress-induced acute cardiac dysfunction in
human and in rat. Satellite symposium of
5th congress of the international society for
autonomic neuroscience, Wakayama, Japan,
2007.10
 12. Ueyama T, Tsuruo Y, Ishikura F.
Catecholamine and estrogen are involved
in the pathogenesis of stress-induced acute
heart attack. 9th symposium on
catecholamines and other neurotransmitters
in stress, Smolenice Castle, Slovakia,
2007.6
 13. Ueyama T. Experimental findings of
takotsubo disease. 第71回日本循環器学
会学術集会 ESC-JCS Joint Symposium,
神戸, 2007.3
 14. Ueyama T. Catecholamine and estrogen are
involved in the pathogenesis of
stress-induced acute heart attack. 第84回
日本生理学会大会シンポジウム, 大
阪, 2007.3
 15. 上山敬司, 鯨和人, 川辺哲也, 伊藤隆
雄, 鶴尾吉宏. 情動的ストレスによる
c-Fos 発現に対する去勢の影響. 第112
回日本解剖学会総会, 大阪, 2007.3
 16. 上山敬司, 鯨 和人, 川辺哲也, 伊藤
隆雄, 鶴尾吉宏. Castration alters c-Fos
response to immobilization stress in the rat
brain. 第29回日本神経科学大会, 京都,
2006.7
 17. Matsuda A, Kitamoto M, Takeuchi H,
Asanuma T, Ishikura F, Beppu S, Ueyama
T. Preconditioning stress could reduce
the acute emotional stress-induced cardiac
dysfunction in rats: An echocardiographic
study American Society of
Echocardiography 17th Annual Scientific
Sessions, Baltimore, USA, 2006.6
 18. Matsuda A, Takeuchi H, Asanuma T,
Ishikura F, Beppu S, Ueyama T. Acute
Preventing Effects of Arotinolol on
Stress-induced hyperkinesis in a rat:
Echocardiographic observation. American
Society of Echocardiography 17th Annual
Scientific Sessions, Baltimore, USA,
2006.6
 19. Matsuda A, Kitamoto M, Takeuchi H,
Asanuma T, Ishikura F, Beppu S, Ueyama
T. Acute Preventing Effects of Arotinolol
on Stress-induced hyperkinesis in a rat:
Echocardiographic observation. American
Society of Echocardiography 17th Annual
Scientific Sessions, Baltimore, USA, 2006.
6
 20. 上山敬司, 伊藤隆雄, 仲井沙織, 鶴尾吉宏.
情動的ストレスによる脳, 副腎, 心臓で
の c-fos 発現に対するエストロゲンの効
果. 第111回日本解剖学会総会, 相模
原, 2006.3
 21. 上山敬司, 笠松謙, 羽野卓三, 赤阪隆史,
石蔵文信, 松田章子, 別府慎太郎.
Estrogen attenuates the emotional
stress-induced activation of the
sympathoadrenal-projecting central
neurons in an animal model of
takotsubo cardiomyopathy. 第70回
日本循環器学会学術集会, 名古屋,
2006.3
 22. 上山敬司, 鶴尾吉宏, 羽野卓三, 石蔵文信,
松田章子, 別府慎太郎. 情動的ストレス
に対するエストロゲンの脳, および心臓
に対する効果 - c-fos 発現による検討.
第58回日本自律神経学会, 千葉, 2005.
10
 23. 上山敬司, 伊藤隆雄, 鶴尾吉宏. Estrogen
alters c-Fos response to immobilization
stress in the brain of ovariectomized rats.
第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005.
7
6. 研究組織
(1) 研究代表者
上山 敬司 (Ueyama Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50264875
(2) 研究分担者
羽野 卓三 (Hano Takuzo)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90156381
鶴尾 吉宏 (Tsuruo Yoshihiro)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90207449
川邊 哲也 (Kawabe Tetsuya)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60508034